

УДК 577.352.2

ЭФФЕКТЫ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЗАРЯДА В ПРОВОДИМОСТИ ОДИНОЧНЫХ КАНАЛОВ, ОБРАЗОВАННЫХ СИРИНГОМИЦИНОМ Е В ЛИПИДНЫХ БИСЛОЯХ

© 2001 г. В. В. Малев^{1,2}, Ю. А. Каулин¹, Ф. А. Гурьев¹, С. М. Безруков^{3,4}, Д. Такетомо⁵,
Л. В. Щагина¹

1Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4;

факс: (812)247-03-41; электронная почта" LVSCHAG@mail.cytspb.rssi.ru;

2С.-Петербургский государственный университет;

3Национальный институт здоровья, Бетезда, Мериленд, США;

4С.-Петербургский институт ядерной физики РАН, 188350 Гатчина;

5Университет штата Юта, Логан, Юта, США

Поступила в редакцию 23.12.1999 г.

После доработки 8.08.2000 г..

В работе исследована каналоформерная активность антибиотика сирингомицина Е (СМЕ), продуцируемого фитопатогенными бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Измерялась проводимость *G* одиночных СМЕ-каналов в заряженных и незаряженных мембранах в зависимости от концентрации соли *C* и pH, разделяемых мембраной водных растворов, и от трансмембранный разности потенциалов *V*. Для всех изученных систем наблюдалась нелинейные и асимметричные относительно знака *V* вольт-амперные кривые. Степень нелинейности и асимметрии зависит от поверхностного заряда мембран и ионного состава водных растворов. Совпадение вольт-амперных кривых при замене NaCl на RbCl указывает на постоянство размера канала в измеренном диапазоне *V* (-250...+250 мВ) и сохранение их анионной активности. В заряженных мембранах удельная электропроводность одиночных каналов *G/G*, экстраполированная на нулевое значение *V*, мало зависит от концентрации NaCl (pH 6) в водном растворе. В случае незаряженных мембран величина *G/C* обратно пропорциональна корню квадратному из концентрации NaCl (pH 6). Рост проводимости каналов в заряженных мембранах, разделяющих 0,1 М заряда мембран ионами кальция указывает на влияние поверхностного потенциала мембран на проводимость каналов. Показано, что пространственное распределение зарядов мембранны и канала ответственно за наблюдаемые эффекты. Проведенные на основе этих представлений оценки согласуются с экспериментальными результатами.

Исследования механизмов ионного транспорта через каналы клеточных мембран показали, что важную роль в этом процессе играют поверхностные заряды мембран и заряды, входящие в структуру канала [1–7]. Роль поверхностных зарядов мембран в функционировании каналов исследуется как на клеточных мембранах, так и на модельных липидных бислоях, с введенными в них каналоформерами или встроенными канальными комплексами клеточных мембран [8–10]. Заряды клеточной мембранны, различные на внешней и внутренней ее сторонах [11], определяют внутримембранные поле в покое и, следовательно, потенциалозависимость функционирования каналов за счет влияния поля на подвижные воротные заряды. Взаимодействие транспортируемых ионов с этими зарядами обусловливают селективность и величину токов, протекающих через каналы. Если о функциональной организации катионных каналов клеточных мембран из-

вестно достаточно много, то о механизмах транспорта анионов известно гораздо меньше.

В этой связи следует выделить продуцируемые бактериями *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* каналоформеры, сирингомицин Е (СМЕ) и сирингопептин 25-А, молекулы которых заряжены положительно, вследствие чего образуемые ими в липидных мембранах каналы преимущественно анионселективны. Эти каналы имеют достаточно большой радиус (≈ 1 нм) и характеризуются выраженной потенциалозависимостью открывания и закрывания, а также нелинейностью и асимметрией относительно знака приложенной разности потенциалов вольтамперных кривых [12–17]. Каналы, формируемые СМЕ в липидных бислоях, следует рассматривать в качестве одной из модельных систем, которую можно использовать для выяснения роли зарядов мембранных липидов и молекул каналоформера в транспорте анионов через эти каналы. Так, роль зарядов в потенциалозависимости открывания–закрывания этих

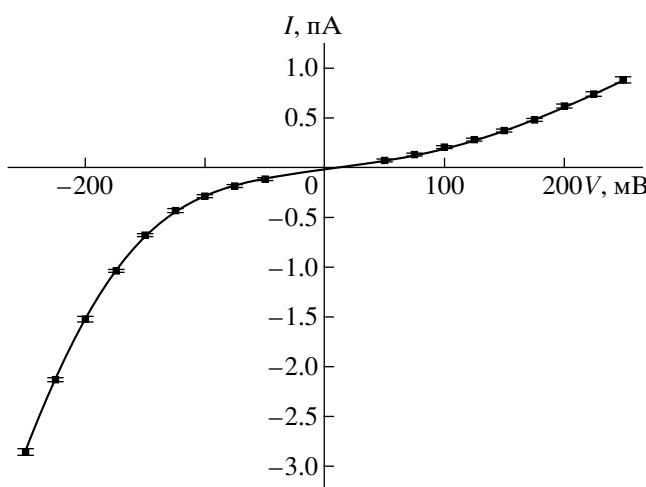


Рис. 1. Вольтамперная кривая для малых одиночных сирингомициновых (СМЕ) каналов. Мембрана сформирована из эквимолярной смеси ДОФС/ДОФЭ, состав водного раствора 0.1 M NaCl, pH 6. Концентрация СМЕ 3 мкг/мл. Здесь и далее вертикальные линии у точек – стандартные отклонения от среднего значения.

каналов исследовалось нами ранее в работе [16]. Была также изучена зависимость катион-анионной функции СМЕ-каналов в бислоях, сформированных из эквимолярной смеси заряженных и незаряженных фосфолипидов, от концентрации NaCl в окружающих мембраны растворах [13]. Результаты этой и последующей [14] работ позволили оценить радиус канала и заряд на его стенках, равные 1 нм и 1 электронной единице заряда соответственно. Тем не менее осталось неясным, какова детальная структура канала (распределение в нем зарядов). Также неясны причины суперлинейности вольт-амперных кривых одиночных СМЕ-каналов относительно трансмембранныго потенциала, а также их асимметрии относительно его знака [12, 13, 15].

Данная работа посвящена исследованию влияния зарядов мембранообразующих липидов и молекул СМЕ на проводимость одиночных СМЕ-каналов. Анализ экспериментальных результатов показал, что суперлинейность и асимметрия вольт-амперных кривых одиночных СМЕ-каналов определяются главным образом наличием асимметричного пространственного распределения зарядов по толщине мембранны.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Бислойные липидные мембранны (БЛМ) формировали по методу Монтала и Мицлера [18] из липидных монослоев на отверстии диаметром 30–40 мкм в тефлоновой перегородке толщиной 10 мкм, разделяющей два отделения камеры (*цис-*- и *транс*-отделения). Объем каждого отделения камеры со-

ставлял 1,6 мл. Перед началом процесса формирования мембранны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывалось скваленом. БЛМ формировали из растворов, содержащих эквимолярные концентрации диолеилфосфатидилэтаноламина (ДОФЭ) и диолеилфосфатидилсерина (ДОФС) или из дифитаноилфосфатидилхолина (ДФФХ) в гексане.

Эксперименты проводились при комнатной температуре при одинаковом ионном составе разделяемых мембраной водных растворов. Кислотность водных растворов поддерживалась буферной смесью MOPS(5 mM)/NaOH. СМЕ растворяли в 10⁻³ M HCl до концентрации 1 мг/мл и добавляли к водной фазе *цис*-отделения камеры в количестве 1–10 мкл, что не вызывало изменения pH растворов.

Для подачи потенциала и отведения сигнала с мембранны использовали хлорсеребряные электроды (Ag/AgCl). Положительным считался потенциал, который вызывает поток катионов из *цис*- в *транс*-раствор. Регистрацию токов через ионные каналы в мембране проводили с помощью операционного усилителя с сопротивлением обратной связи 1.5 × 10¹⁰ Ом. Сигнал с выхода усилителя подавался через АЦП на вход персонального компьютера (IBM PC, 486 DX-2-100). Для всех трансмембранных потенциалов строили гистограммы распределения токов через одиночные каналы и проводили аппроксимацию гистограмм функцией Гаусса. Из максимума гауссовой кривой находилась величина среднего тока через одиночный канал с погрешностью, определяемой среднеквадратичным отклонением. В ряде экспериментов при сравнении вольт-амперных характеристик одиночных СМЕ каналов в растворах разных солей или их концентраций для уменьшения погрешности определения токов одиночных каналов проводили измерения на одной мемbrane. Анализ распределения каналов по уровням протекающего через них тока осуществляли с использованием программы Origin (Microcal).

Сирингомицин Е выделен и очищен, как описано в [19]. В работе использовали NaCl, RbCl, CaCl₂ марки о.с.ч., MOPS и сквален фирмы "Sigma" (США), ДОФЭ и ДФФХ фирмы "Avanti Polar Lipids", (США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1 представлена вольт-амперная кривая для СМЕ-каналов низкой проводимости ("малых" каналов) в мембранах, сформированных из смеси ДОФЭ/ДОФС (1 : 1, M : M) и омываемых раствором 0,1 M NaCl, pH 6. Аналогичные кривые I(V) наблюдаются и для так называемых "больших" каналов, с той разницей, что их проводимость примерно в шесть раз превышает проводимость

малых каналов. Как видно из рисунка, кривая $I(V)$ суперлинейна и асимметрична относительно знака V . "Суперлинейность" при отрицательных значениях V характеризуется изменением в 26 раз при изменении V в 5 раз в диапазоне: $-50\ldots-250$ мВ. В области положительных значений V суперлинейность выражена значительно меньше. Аналогичные зависимости тока через одиночные СМЕ-каналы от V для БЛМ, сформированных из той же смеси липидов, наблюдаются в широком интервале концентраций NaCl ($1.0\ldots0.03$ М, pH 6) (рис. 2). На этом рисунке приведены зависимости удельной электропроводности одиночных каналов $\lambda = I/VC$ от V (здесь C – концентрация соли в окружающем мембрану растворе). Далее λ будем называть просто "электропроводностью", смысл же ее использования определяется следующим. Известно, что объемная проводимость раствора в первом приближении пропорциональна концентрации соли. Поэтому обнаружение существенных изменений этого параметра при переменной C будет говорить об отличии условий диффузии ионов в канале от имеющих место в объеме раствора, например за счет поверхностного заряда мембран и/или стенок канала. Данные рис. 2 демонстрируют как близкую форму кривых для разных концентраций NaCl , так и слабую зависимость электропроводности от концентрации соли. Последнее, как это уже отмечалось, могло бы быть результатом достаточно большого радиуса канала, такого, что условия переноса в нем ионов практически те же, как и в толще водного раствора. Причиной же обнаруживаемой суперлинейности вольт-амперных кривых может быть увеличение размеров канала с ростом $|V|$, например за счет зависимости натяжения мембранны от потенциала [20–22].

Ответ на вопросы, одинаковы ли условия переноса ионов в канале и в толще водного раствора, а также изменяются ли размеры канала с изменением трансмембранных потенциала, был получен при сравнении проводимостей одиночных каналов в 1 М растворах NaCl и RbCl . Замена Na^+ на Rb^+ в окружающем мембрану растворе должна приводить к росту тока через одиночные СМЕ-каналы приблизительно в 1,2 раза, если условия переноса ионов в канале близки к реализующимся в толще водных растворов $((\lambda_{\text{Cl}^-} + \lambda_{\text{Rb}^+})/(\lambda_{\text{Cl}^-} + \lambda_{\text{Na}^+})) \approx 1.2$, где λ_i – эквивалентная электропроводность иона i). Результаты измерения зависимости токов через одиночные СМЕ-каналы от V с заменой 1 М NaCl на 1 М RbCl приведены на рис. 3. Совпадение этих кривых с погрешностью, не превышающей 5%, говорит о малости числа переноса катионов во всем исследуемом интервале V , т.е. свидетельствует о сохранении как преимущественно анионной селективности канала, так и его размеров в изученном диапазоне V (от -250 до 250 мВ).

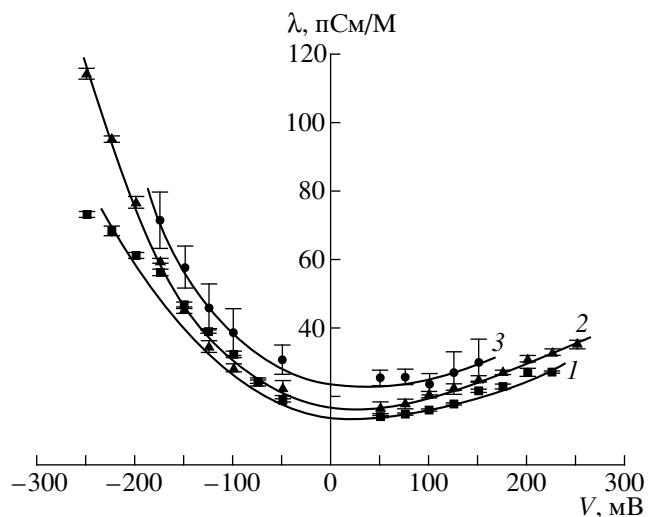


Рис. 2. Зависимость удельной электропроводности (λ) малых СМЕ-каналов в заряженных мембранах из эквимолярной смеси ДОФС/ДОФЭ от трансмембранных разности потенциалов. Концентрация NaCl (pH 6), м: 1 – 1.0; 2 – 0.1; 3 – 0.03.

Ранее было показано [12, 17], что в формировании проводящего канала участвуют по крайней мере 6 молекул СМЕ, каждая из которых (при pH 6) несет один отрицательный и 3 положительных заряда. Вместе с тем анализ экспериментальных результатов по зависимости чисел переноса анионов в СМЕ-канале от концентрации соли [13], а также по зависимости стабильности кластеров СМЕ-каналов от заряда мембранообразующих фосфолипидов [14] позволил предположить, что липидные молекулы входят в структуру канала. Последнее означает, что в структуре СМЕ-канала присутствуют заряды разного знака, поскольку указанные выше результаты были получены в условиях, когда входящие в мембранны

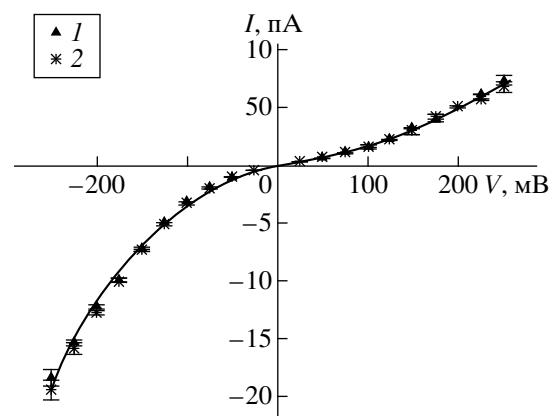


Рис. 3. Вольт-амперные кривые малых СМЕ-каналов в мембранах из эквимолярной смеси ДОФС/ДОФЭ. Водный раствор содержит 1 М NaCl (1) и RbCl (2), pH 6.

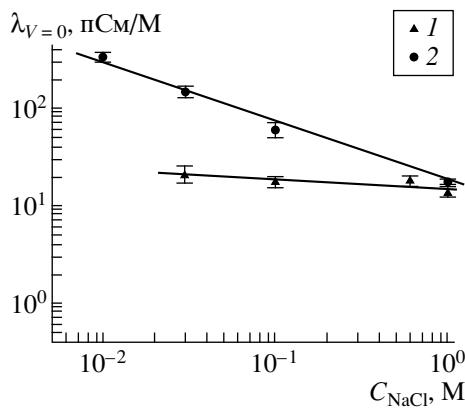


Рис. 4. Зависимость электропроводности малых SME-каналов в условиях нулевого тока (при $V=0$ мВ) в заряженных и незаряженных мембранах от концентрации NaCl (рН 6) в водном растворе. 1 – эквимолярная смесь ДОФС/ДОФЭ; 2 – ДФФХ.

молекулы фосфолипида ДОФС заряжены отрицательно (рН 6), а молекулы сирингомицина несут в целом положительный заряд. Слабая зависимость электропроводности SME каналов от концентрации электролита C в заряженных мембранных (рис. 2) может быть связана с противоположным его влиянием на величину поверхностного потенциала мембранны и стенок канала, имеющих заряд различного знака. Действительно, с ростом ионной силы раствора экранирование отрицательного поверхностного заряда мембранны должно приводить к увеличению концентрации анионов на входе (выходе) в(из) канал(а). Однако

экранирование положительного заряда SME приводит к снижению концентрации проникающих анионов в канале.

Для проверки этого предположения была исследована зависимость проводимости SME-каналов в незаряженном фосфолипиде (ДФФХ) от концентрации соли в омывающем мембрану растворе при рН 6. В случае незаряженного липида вольт-амперные кривые SME-каналов, как и в отрицательно заряженных мембранных, суперлинейны, но величина удельной электропроводности достаточно сильно зависит от концентрации NaCl . Уменьшение концентрации соли в окружающих незаряженные мембранны растворах приводит к увеличению электропроводности SME каналов. Зависимость электропроводности SME-каналов, экстраполированной на нулевую разность приложенных к мембрane потенциалов, от концентрации омывающих мембранны растворов для заряженных и незаряженных БЛМ представлена на рис. 4. Из этого рисунка видно существенное различие приведенных кривых: для незаряженных мембранных электропроводность обратно пропорциональна квадратному корню из концентрации NaCl , в то время как для заряженных – зависимость от C бывает линейна. Выявленная в случае незаряженных БЛМ зависимость λ от C говорит о наличии заряда в канале, а спад λ от C указывает на положительный знак заряда в канале. Эти результаты являются еще одним подтверждением участия молекул фосфолипидов, образующих мембранны, в формировании как самого SME-канала, так и условий транспорта ионов в нем. Таким образом, выдвинутое ранее предположение о компенсации эффекта ионной силы за счет наличия в системе зарядов разного знака можно считать согласующимся с данными по незаряженным липидам.

Дополнительная проверка этого предположения может быть проведена при нейтрализации (титровании) мембранных и отрицательных SME-зарядов за счет уменьшения рН омывающего мембранны раствора [10]. Величины рК отрицательно заряженных групп ДОФС и SME равны 3.0 и 2.8 соответственно [23, 24]. Поэтому нами были проведены измерения электропроводности каналов в БЛМ, сформированных из эквимолярной смеси ДОФС/ДОФЭ, разделяющих 0.1 М растворы NaCl для интервала рН 2–4. Результаты этих измерений показаны на рис. 5. Для сравнения здесь же приведены данные для незаряженных мембранных (из ДФФХ) в растворах 0.1 М NaCl при рН 6. Судя по приведенным на рис. 5 данным, уменьшение рН вызывает рост проводимости каналов. Таким образом, снижение липидного и отрицательного SME-заряда в результате его нейтрализации H^+ -ионами приводит к тому же эффекту, что и замена заряженного липида на незаряженный, т.е. к увеличению электропроводности SME-

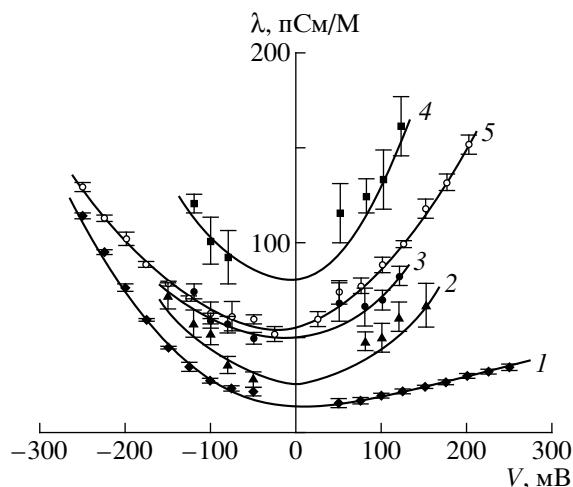


Рис. 5. Влияние рН водных растворов и поверхностного заряда мембранны на электропроводность малых SME-каналов в 0.1 М растворах NaCl . Заряженные мембранны сформированы из эквимолярной смеси ДОФС/ДОФЭ: 1 – рН 6; 2 – рН 4; 3 – рН 3, 4 – рН 2. Незаряженные мембранны сформированы из ДФФХ: 5 – рН 6.

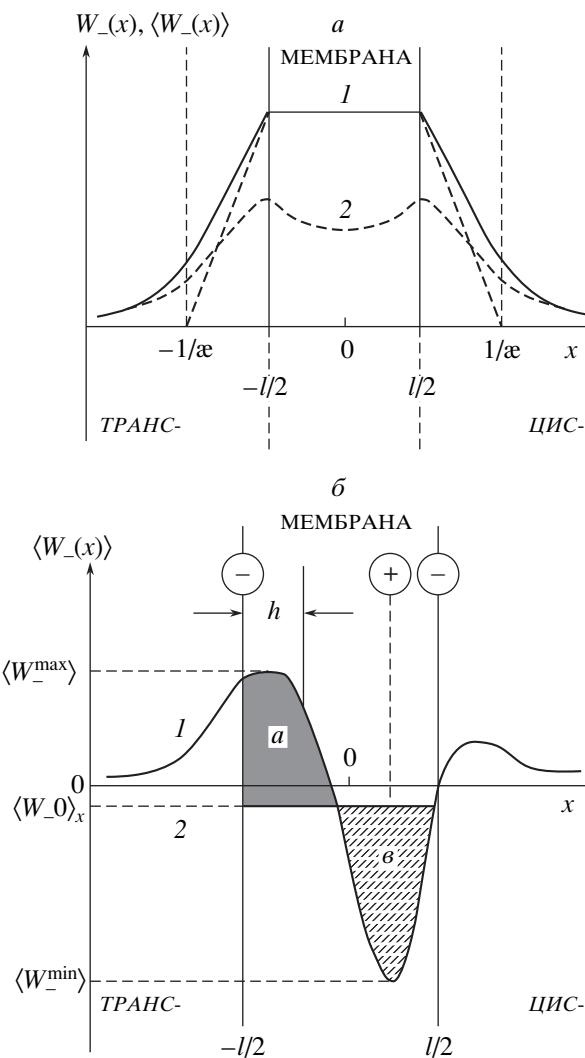


Рис. 6. Схематическое изображение профиля потенциальной энергии аниона. а: 1 – профиль энергии аниона $W(x)$ вдали от канала; 2 – профиль энергии аниона $\langle W(x) \rangle$, усредненный по радиусу канала без учета заряда внутри канала (объяснения в тексте).

б: 1 – профиль потенциальной энергии аниона $\langle W(x) \rangle$, усредненный по радиусу канала с учетом присутствия в последнем положительного заряда; 2 – потенциальная энергия аниона $\langle W_0 \rangle_x$, усредненная по длине канала (объяснения в тексте). (+) – заряд канала, (–) – поверхностный заряд мембранны, $1/\kappa$ – толщина диффузного слоя в примыкающих к мембрane водных растворах, l – толщина мембранны (длина канала).

канала. Следует добавить, что в обоих случаях наблюдается изменение характера асимметрии вольт-амперных кривых, но их суперлинейность при этом сохраняется.

При обсуждении данных по титрованию поверхностного заряда БЛМ ионами водорода следует считаться с возможным вкладом переноса этих ионов в обнаруживаемые изменения проводимости канала. При концентрациях ионов H^+ ниже 10^{-3} М их вклад в проводимость СМЕ-каналов должен быть незначительным. Однако достаточно большие изменения проводимости СМЕ-каналов наблюдаются и при более высоких рН, что говорит о несущественности вклада H^+ ионов в проводимость каналов, по крайней мере при $pH \geq 3$.

Еще одним подтверждением совместного влияния липидного и СМЕ-зарядов на электропроводность канала являются результаты измерений проводимости каналов в БЛМ, сформированных из эквимолярной смеси ДОФС/ДОФЭ и разделяющих растворы 0.1 или 0.01 М $CaCl_2$ (рН 6). Адсорбция Ca^{+2} может происходить не только на поверхности мембранны, снижая ее отрицательный поверхностный заряд, но и вблизи устьев и внутри канала, увеличивая его положительный заряд. Результатом этого является повышение концентрации анионов внутри СМЕ-каналов и соответствующее увеличение их электропроводности по сравнению с растворами $NaCl$. Вместе с тем, как это имеет место для модифицированных СМЕ

мембран из незаряженного липида или при низких значениях pH омывающих заряженные мембранны растворов, титрование отрицательных зарядов ионами Ca^{+2} приводит также к симметризации вольт-амперных кривых с сохранением их суперлинейности (данные не приведены).

Таким образом, совокупность данных, полученных в условиях титрования заряда БЛМ или при замене заряженного мембранный липида на незаряженный, так же как и отсутствие зависимости электропроводности от ионной силы раствора в случае заряженных мембранных позволяют говорить о совместном влиянии отрицательного заряда мембранных липидов и положительного заряда каналаформера на проводимость СМЕ-каналов.

В качестве априорного предположение о совместном влиянии указанных зарядов было введено нами при обсуждении зависимости чисел переноса ионов хлора от ионной силы раствора для БЛМ, образованных из эквимолярной смеси ДОФС/ДОФЭ [13]. Именно это предположение о позволило нам оценить радиус канала. Полученное в дальнейшем независимое подтверждение этой оценки по влиянию полиэтиленгликолей на проводимость СМЕ-каналов [14], а также приведенные здесь доказательства правомерности использования этого допущения, позволяют анализировать проводимость СМЕ каналов в рамках одного физического представления.

В корректной постановке анализ характера вольт-амперных кривых СМЕ каналов требует решения неоднородного и нелинейного уравнения Пуассона для расчета распределения потенциала как внутри самого канала, так и в прилегающих к нему областях мембранны и водного раствора. Решение такой задачи пока не представляется возможным. Поэтому для обсуждения вида вольтамперных характеристик СМЕ каналов в заряженных мембранных ниже будут использоваться в полукачественной форме соображения о профиле потенциальной энергии проникающих ионов в канале, применявшиеся ранее при анализе проводимости тонких мембранны [25] (см. также [26]). При этом следующее ниже рассмотрение будет выполнено с учетом поверхностного заряда мембранны в системе ДОФС/ДОФЭ.

Поскольку радиус водной поры в СМЕ канале достаточно велик (1 нм), то вкладом неуклоновских составляющих изменения потенциальной энергии проникающих ионов (в частности, борновской энергии поляризации ионом окружающей среды) можно пренебречь, ограничиваясь лишь учетом кулоновской энергии: $W_i = z_i F \Phi(x)$, где $\Phi(x)$ – локальное значение разности потенциалов, отсчитываемое от толщины цис-отделения ($x = \infty$), x – расстояние до середины мембранны ($x = 0$), z_i – заряд рассматриваемого иона, $i = \pm$, F – число

Фарадея. На рис. 6, а схематически изображены изменения W_i как функция расстояния x в условиях отсутствия внешней разности потенциалов. Сплошная кривая 1 этого рисунка соответствует ходу изменений энергии для участков мембранный системы вдали от устья канала ($W_{\pm}(x)$) и, очевидно, определяется величиной поверхностного заряда мембранны и его экранированием в водном растворе, т.е. ионной силой раствора. Штриховая кривая 2 (рис. 6, а) соответствует значениям энергии $\langle W_{\pm}(x) \rangle$, усредненным по сечению цилиндрической трубы раствора радиуса R , включающей канал (в области расстояний $-l/2 \leq x \leq l/2$, где l – длина канала), без учета вклада заряда молекул СМЕ, участвующих в организации канала. В зоне расстояний $l/2 \leq |x| \leq l/2 + 1/k$ значения усредненного электрического потенциала, а следовательно, и усредненной энергии $\langle W_{\pm} \rangle$, должны быть по модулю меньше абсолютных значений W_{\pm} , реализующихся вдали от канала. Здесь $1/k$ – толщина диффузной части электрического двойного слоя в примыкающих к мембранны водных растворах. Аналогичная ситуация должна иметь место и внутри канала (в зоне расстояний: $-l/2 < x < l/2$), поскольку заряд поверхностей мембранны должен частично компенсироваться и зарядом электролита, находящегося в канале. Поэтому соответствующая кривая потенциальной энергии аниона должна обладать двумя максимумами, расположеннымими в зоне устьев канала, и минимумом – в его середине (см. кривую 2 на рис. 6, а). Соответствующие профили энергии для катионов будут иметь тот же вид, но знак энергии должен быть противоположным.

Наличие в целом положительного заряда молекул СМЕ, участвующих в организации канала, должно существенно изменять распределения энергии $\langle W_i \rangle$ по расстоянию x . Если полагать, что заряд распределен несимметрично относительно середины мембранны, указанием на что является наблюдаемая асимметрия вольт-амперных характеристик канала, то возникающий профиль энергии аниона можно схематически представлять в виде кривой 1 на рис. 6, б. Минимум энергии на этой кривой, соответствующий локализации положительных зарядов СМЕ, в отличие от минимума кривой 2 на рис. 6, а, должен быть выражен настолько сильно, что значения среднего по сечению электрического потенциала $\langle \Phi(x) \rangle_R$, усредненные затем по длине канала $\langle \langle \Phi \rangle_R \rangle_x = (1/l) \int_{-l/2}^{l/2} \langle \Phi(x) \rangle_R dx$, должны быть большими нуля, чтобы число переноса аниона было больше катионного. Горизонтальная кривая 2 на рис. 6, б, удовлетворяющая равенству площадей заштрихованных зон а и в этого рисунка, приближенно соответствует такому значению $\langle W_{\pm} \rangle_x = z_i F \langle \langle \Phi \rangle_R \rangle_x$ (строгое соответствие имеет место в случае зна-

чений $|\langle \Phi(x) \rangle_R| \ll RT/F$, где R – газовая постоянная, T – абсолютная температура). Возникающий в результате профиль потенциальной энергии анионов, преимущественно проникающих через СМЕ-канал, характеризуется наличием небольшого барьера на входе в канал (со стороны цис-отделения), достаточно глубоким минимумом в зоне локализации положительных зарядов СМЕ и последующим относительно широким барьером для выхода ионов в транс-отделение системы.

Об амплитуде изменений $\langle W_- \rangle$ можно судить по значениям поверхностного потенциала мембраны $\Phi(\pm l/2)$, соответствующего большим удалениям (по радиальной координате) от устья канала. Так, в случае эквимолярной смеси ДОФС/ДОФЭ при концентрациях NaCl, равных 0.1 и 1 М, значения поверхностного потенциала составляют -112 и -56 мВ соответственно [13]. Эти величины рассчитаны из значений средней плотности мембранных заряда без учета связывания катионов с сериновым остатком липидных молекул бислоя. Учет эффекта связывания катионов приводит к снижению мембранных потенциала [27]. С другой стороны, величины $\langle\langle \Phi \rangle_R \rangle_x$ (т.е. значения потенциалов, усредненные как по радиусу, так и по длине канала), судя по измеряемым числам переноса t_{Cl} , оказываются при этом равными 11.5 и 5 мВ соответственно [13]. Поэтому даже в случае 1 М раствора NaCl изменение энергии $\Delta\langle W_- \rangle = \langle W_-^{\min} \rangle - \langle W_-^{\max} \rangle \equiv F\Phi(\pm l/2)$ при переходе от минимума к максимуму кривой 1 на рис. 6 б должно быть порядка $(2-4)RT$. Это соответствует приблизительно 10–50-кратным относительным изменениям концентрации аниона при том же переходе. Эти и еще более значительные в случае менее концентрированных растворов различия концентраций преимущественно проникающих через канал ионов позволяют рассматривать стадии переноса анионов в зоне энергий, близких к $\langle W_-^{\max} \rangle$, в качестве лимитирующих при прохождении канала этими частицами. В то же время стадии переноса для менее положительных $\langle W_- \rangle$ следует полагать протекающими в обратимых условиях, что соответствует равновесному характеру распределения концентрации аниона до и после плоской вершины барьера с $\langle W_- \rangle \gg \langle W_-^{\max} \rangle$.

При наложении на БЛМ внешней разности потенциалов линии тока внутри канала должны быть практически параллельны друг другу (из-за отсутствия потока ионов через стенку канала) и существенно гуще, чем в толще водных растворов. В частности, плотность тока внутри канала должна превышать таковую для объемов раствора в $1/\pi R_0^2 N_{ch}$ раз, где N_{ch} – число каналов на единице поверхности мембранны, $R_0 \approx 1$ нм – радиус

канала. Иными словами, в зоне устьев канала должно возникать разветвление линий тока из-за протекающего здесь радиального переноса ионов. Существующие в этих зонах дополнительные скачки потенциала по отношению к имеющим место в условиях нулевого тока не могут быть велики [28], так как полусферический характер электродиффузии к (или от) весьма малому по площади каналу обеспечивает высокую скорость подвода (отвода) проникающих частиц. Поэтому основная часть приложенной разности потенциалов обязана реализоваться внутри канала и делиться примерно в соотношении $h/(l-h)$, где h – ширина основного барьера с энергией анионов $\langle W_- \rangle \gg \langle W_-^{\max} \rangle$, между зонами расстояний x на вершине барьера и остальной части канала. Возникающая таким образом асимметрия зависимости концентраций аниона от V на подходе к барьеру и выходе с него определяет наблюдаемую на опыте асимметрию вольт-амперных кривых относительно знака приложенной внешней разности потенциалов. Так, сугубо необратимый характер переноса аниона на вершине барьера будет приводить к приближенно линейной зависимости эффективной константы переноса анионов через этот барьера (k_b) от $V(k_b = k_b^0 V)$ при наличии в этой зоне не слишком больших скачков потенциала $|hV/l| > (z_iF)^{-1} \langle W_-^{\max} \rangle (k_b^0 – \text{константа переноса в условиях равновесия})$. Поэтому скорости прохождения анионов в транс- и цис-направлении будут определяться в основном изменениями с потенциалом концентраций аниона $C_{-(l/2)}$ и $C_{(h-l/2)}$ со стороны входящих потоков: $j_{\text{trans}} \approx k_b C_{-(l/2)}$ и $j_{\text{cis}} \approx k_b C_{(h-l/2)}$ соответственно. Следует отметить, что аналогичное заключение, но в условиях симметрии и высокой крутизны профиля потенциальной энергии проникающих частиц, было сделано на количественном уровне для транспорта ионов через объем тонкой мембранны [25].

При движении аниона из цис- в транс-отделение системы, т.е. при $V < 0$, его концентрация перед входом на вершину барьера $C_{(h-l/2)}$ возрастает в $\exp[-(l-h)VF/RT]$ раз по сравнению с равновесной. При обратном направлении движения аниона ($V > 0$) увеличение концентрации $C_{-(l/2)}$ составляет только $\exp[\gamma VF/RT]$ раз, где $\gamma \ll (l-h)/l$ – доля внешней разности потенциалов, реализующаяся в водном растворе вблизи устья канала. Это и приводит к наблюдаемой асимметрии и нелинейности вольт-амперных характеристик СМЕ-канала, по крайней мере для заряженных мембран при не слишком высоких концентрациях омывающего электролита. Вместе с тем характер асимметрии должен меняться как с ионной силой раствора, так и с изменением поверхностного заряда мембранны.

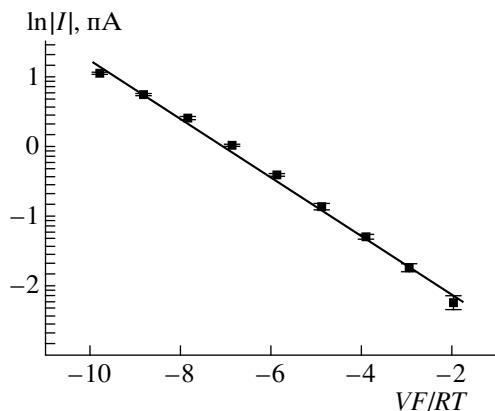


Рис. 7. Зависимость $|I|$ от VF/RT в зоне отрицательных V . Мембрана сформирована из эквимолярной смеси ДОФС/ДОФЭ. Состав водного раствора: 0.1 M NaCl, pH 6.

Из проведенного обсуждения следует, что вольт-амперная характеристика СМЕ-канала в зоне отрицательных V должна быть близка к экспоненциальной, в то время как при $V > 0$ – практически линейной. Как видно из представленных на рис. 7 результатов, именно такой ход $I(V)$ кривой наблюдается на опыте для $V < 0$, (для $V > 0$ см. рис. 1). В соответствии со сказанным выше угол наклона зависимости $\ln|I(V)|$ от VF/RT (при $V < 0$) должен быть порядка $((l-h)/l)$, т.е. отношения зоны переменной энергии $W_{(x)}$ к толщине мембранны. Из данных рис. 7 следует, что это отношение равно 0.42 ± 0.01 . Значительность зоны высоких энергий $\langle W_{(x)} \rangle \cong \langle W_{(x)}^{\max} \rangle (h/l \cong 0.58)$ должна означать близость расположения положительных зарядов СМЕ к поверхности мембранны со стороны цис-отделения системы. Хотя полученная информация о структуре СМЕ-канала носит полуколичественный характер, ясно, что наблюдаемые особенности проводимости одиночных СМЕ-каналов, по крайней мере для заряженных мембранны, непротиворечивым образом объясняются за счет эффектов пространственного распределения заряда.

Авторы выражают благодарность Ю.А. Ермакову за полезную дискуссию при обсуждении результатов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 97-04-49623).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hille B. Ionic channels of excitable membranes. Sunderland Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1992. P. 426.
2. Mozhayeva G.N., Naumov A.P. // Nature. 1970. V. 228. P. 164–165.
3. Наумов А.П. Функциональная организация натриевых каналов возбудимых мембранны: Дис. ... докт. биол. наук. Ленинград: ИНЦ АН СССР, 1985. С. 358.
4. Костюк П.Г. Кальций и клеточная возбудимость. М.: Наука, 1986. С. 255.
5. Tu Q., Velez P., Cortez-Gutierrez M., Fill M. // J. Gen. Physiol. 1994. V. 103. P. 853–867.
6. Deutsch N., Matsuoka S., Weiss J.N. // J. Gen. Physiol. 1994. V. 104. P. 773–800.
7. Zamponi G.W., French R.J. // J. Membr. Biol. 1995. V. 147. P. 1–6.
8. Zhou W., Jones S.W. // Biophys. J. 1996. V. 70. P. 1326–1334.
9. Corringer P.J., Bertrand S., Galzi J.L., Devillers-Thierry A., Changeux J.P., Bertrand D. // Novartis Found. Symp. 1999. V. 225. P. 215–224; discussion P. 224–230.
10. Rostovtseva T.K., Aguilella V.M., Vodyanoy I., Bezrukova S.M., Parsegian V.A. // Biophys. J. 1998. V. 75. P. 1783–1792.
11. Krasilnikov O.V., Merzlyak P.G., Yldasheva L.N., Rodrigues C.G., Nogueira R.A. // Biochim. et biophys. acta. 1999. V. 1417. P. 167–182.
12. Feigin A.M., Takemoto J.Y., Wangspa R., Teeter J.H., Brand J.G. // J. Membr. Biol. 1996. V. 149. P. 41–47.
13. Щагина Л.В., Каулин Ю.А., Фейгин А.М., Такемото Д., Бранд Д., Малев В.В. // Биол. мембранны. 1998. Т. 15. С. 433–446.
14. Kaulin Yu.A., Schagina L.V., Bezrukova S.M., Malev V.V., Feigin A.M., Takemoto J.Y., Teeter J.H., Brand J.G. // Biophys. J. 1998. V. 74. P. 2918–2925.
15. Dalla Serra M., Bernhart I., Nordera P., Di Giorgio D., Ballio A., Menestrina G. // Mol. Plant–Microbe Interact. 1999. V. 12. P. 401–409.
16. Каулин Ю.А., Щагина Л.В. // Цитология. 1999. Т. 41. С. 610–614.
17. Малев В.В., Каулин Ю.А., Безруков С.М., Гурьев Ф.А., Такемото Д., Щагина Л.В. // Биол. мембранны. 2000. Т. 17. № 6. С. 653–665.
18. Montal M., Mueller P. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. P. 3561–3566.
19. Bidwai A.P., Zhang L., Bachmann R.C., Takemoto J.Y. // Plant Physiol. 1987. V. 83. P. 39–43.
20. Русанов А.И. // ДАН СССР. 1972. Т. 203. С. 387–391.
21. Абидор И.Г., Айтъян С.Х., Черный В.В., Черномордик Л.В., Чизмаджев Ю.А. // ДАН СССР. 1977. Т. 245. С. 977–981.
22. Malev V.V., Rusanov A.I. // J. Theor. Biol. 1989. V. 136. P. 295–307.
23. Tatulian S.A. Ionization and ion binding // Phospholipids Handbook / Ed. Cevc G. N.Y.: Marcell Dekker, 1993. P. 511–552.
24. Segre A., Bachman R.C., Ballio A., Bossa F., Grurina I., Iacobellis N.S., Marino G., Pucci P., Simmaco M., Take-moto J.Y. // FEBS Lett. 1989. V. 255. P. 27–31.
25. Малев В.В., Айтъян С.Х., Маркин В.С. // Биофизика. 1975. Т. 20. С. 1019–1024.
26. Hall J.E., Mead C.A., Szabo G. // J. Membr. Biol. 1973. V. 11. P. 75–85.
27. Ermakov Yu.A. // Biochim. et biophys. acta. 1990. V. 1023. P. 91–97.
28. Bezrukova S.M., Vodyanoy I. // Biophys. J. 1993. V. 64. P. 16–25.

Spatial Charge Distribution Effects in the Conductance of Syringomycin e ion Channels Formed in Lipid Bilayers.

V.V. Malev^{1,2}, Yu.A. Kaulin¹, Ph.A. Gurnev¹, S.M. Bezrukov^{3,4}, J.Y. Takemoto⁵,
L.V. Schagina¹

¹Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia;

²St. Petersburg State University, Peterhof, Russia;

³National Institute of Health, Bethesda, MD, USA;

⁴St. Petersburg Nuclear Physics Institute, Russian Academy of Sciences, Gatchina, Russia;

⁵Utah State University, Logan, USA

Channel-forming activity of syringomycin E produced by phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* was studied. By using planar lipid bilayers modified with syringomycin E, the conductance of single channels formed by antibiotic as a function of the transmembrane potential difference (V), the ionic composition, and pH of the bathing solution was measured for different membranes (charged DOPS/DOPE, and uncharged DPPC). For all cases indicated, the current–voltage curves of single channels were superlinear in V and asymmetrical in its sign, the degree of their asymmetry being dependent on variations in the ionic concentration, pH, and the surface membrane charge. The channel conductance did not change when 1 M NaCl was replaced by 1 M RbCl within the range of –250–250 mV. It suggests the absence of voltage-dependent expanding channel lumen as a possible reason for the observed superlinearity of current–voltage curves. The equivalent conductance of channels (the ratio of conductance and the electrolyte concentration) in the zero current conditions was practically independent of the NaCl concentration for pH 6 for DOPS/DOPE. However, the above value was a linear function of the square root concentration of electrolyte for DPPC. At the same time, the channel conductance for charged bilayers increased monotonically, when pH decreased from 6 to 2, which shows the influence of the surface charge titration. A similar effect was observed when a charge titration was performed with Ca^{+2} -ions. It is shown that the spatially distributed charges stemming from the membrane lipids and the channel forming molecules are responsible for the observed features of the channels. The estimates based on this model are in agreement with experimental results.